

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DD 270382 A 19890726 DD 295789 A 19861031 199001 B

Priority Applications (No Type Date): DD 295789 A 19861031

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 270382	A		4		

Abstract (Basic): DD 270382 A

In a new procedure for the colorimetric determination of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) in human and animal material, a substrate of the formula R-Pro-NH-NH₂ (I) (where is a proteinogenic amino acid), pref glycyl-L-proline hydrazide or L-alanyl-L-proline hydrazide, is used which is specifically cleaved by DP IV at pH 7.0-10.0 to give R-Pro (II) and hydrazine, and the enzymatically released hydrazine is reacted with p-dimethylamino-benzaldehyde (III) in alcoholic HCl soln with simultaneous termination of the enzymatic reaction to give a dye which is then determined colorimetrically.

USE/ADVANTAGE - Determination of DP IV (EC 3.4.14.5) in body fluids as a marker for Tm lymphocytes in the differential diagnosis of diseases with lymphocytic reaction and of immunodeficiency syndromes due to various causes (eg AIDS). Determination of DP IV is also of use in basic biotechnological research in the analysis of enzyme kinetic problems and of proteolytic processes involving the release of degradation of pharmacologically and physiologically active peptides. Simple, automatable procedure suitable for use in any medical laboratory.

0/0

Title Terms: DI; PEPTIDYL; PEPTIDASE; IV; COLORIMETRIC; DETERMINE; GLYCOL; ALANYL; PROLINE; HYDRAZIDE; SUBSTRATE; P; DI; METHYLAMINO; BENZALDEHYDE; COLOUR; REAGENT

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Additional): C12Q-001/36; G01N-033/52

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C3; B10-A19; B10-B04A; B11-C07B1; B12-K04A2; B12-K04A4; D05-H09

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E04; S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

03 M423 M750 M903 N102 Q233 V802 V814

05 M423 M760 M903 N102 Q233 V600 V614

Chemical Fragment Codes (M2):

01 F011 F012 F423 H1 H100 H181 H2 H211 J0 J012 J3 J311 J371 K0 K6 K620
M280 M311 M312 M321 M331 M340 M342 M349 M381 M391 M413 M430 M510
M521 M530 M540 M782 M903 M904 N102 P831 Q233 Q505 9001-02301-D
9001-02301-M

02 G013 G100 H1 H103 H141 J4 J431 M210 M211 M273 M282 M320 M414 M430
M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 N102 P831 Q233 Q505 R00699-D
R00699-M

Chemical Fragment Codes (M6):

04 M903 P831 Q233 Q505 R309 R514 R611 R623 R627 R632

Specific Compound Numbers: R00699-D; R00699-M

Generic Compound Numbers: 9001-02301-D; 9001-02301-M

2/9/3

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

B1

003679394

WPI Acc No: 1983-39365K/198317

XRAM Acc No: C83-038415

Inhibition of peptide hydrolase - using N-acyloxy peptide or amino acid amide(s) as specific enzyme-activated enzyme inhibitors

Patent Assignee: FISCHER G (FISC-I)

Inventor: BARTH A; DEMUTH H U; DISCHER G

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DD 158109	A	19821229				198317 B

Priority Applications (No Type Date): DD 229133 A 19810410

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 158109	A		8		

Abstract (Basic): DD 158109 A

New procedure for inhibiting the activity of peptide hydrolases which do not require a free C-terminal carboxyl group in the substrate and which especially contain catalytically active serine or cysteine residues uses as inhibitor substances N-acyloxy-carboxamides (I).

$R-CO-NH-O-CO-R_1$ (I)

(where R is an alpha-amino acid, N-protected alpha-amino acid or peptidyl residue such that the corresponding cpd. contg. a -CO-NH- instead of -CO-NH-O-CO- linkage acts as a substrate for the peptide hydrolase; and R_1 is unsubstd. phenyl or phenyl disubstd. by, preferably, F, Cl, Br, NO_2 , CH_3 or OCH_3), the active inhibitor being an enzyme-activated intermediate of the nitrene type.

Irreversible inhibition of peptide hydrolases such as dipeptidylpeptidase IV, thermolysin (*Thermoplasma acidophilum* protease) and bovine pancreas elastase, in biochemistry, molecular biology, medicine, biochemical genetics, pharmacy and food technology.

Title Terms: INHIBIT; PEPTIDE; HYDROLASE; N; ACYLOXY; PEPTIDE; AMINOACID; AMIDE; SPECIFIC; ENZYME; ACTIVATE; ENZYME; INHIBIT

Derwent Class: B04; B05; D13; D16

International Patent Class (Additional): C12N-009/99

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B10-A18; B12-G01; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M2):

01 F011 F012 F423 G001 G010 G011 G012 G013 G014 G015 G016 G100 H100
H181 H211 H341 H342 H541 H542 H601 H602 H603 H608 H641 H642 J0 J012
J013 J014 J2 J231 J3 J311 J371 J372 K0 K8 K820 K830 L463 M210 M211
M214 M233 M240 M272 M280 M281 M282 M283 M312 M321 M322 M331 M340
M342 M349 M381 M391 M392 M413 M414 M510 M520 M521 M531 M540 M781
M903 P616 Q233 V814 V902 V911 V921

B1

B^e₁



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1581 09

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 9/99

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2291 332

(22) 10.04.81

(44) 29.12.82

(71) siehe (72)

(72) FISCHER, GUNTER, DR. DIPL.-CHEM.; DEMUTH, HANS-ULRICH, DR. DIPL.-BIOCHEM.;
BARTH, ALFRED, PROF. DR. DIPL.-CHEM.; DD;

(73) siehe (72)

(74) MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG, BFN/S, 4020 HALLE(S.), DOMPLATZ 4

(54) VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT VON PEPTIDHYDROLASEN

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur Hemmung unerwünschter peptidhydrolytischer Aktivitäten bei labordiagnostischen, medizinischen und lebensmitteltechnischen Gegebenheiten oder Verfahren. Ziel der Erfindung ist ein leicht anwendbares Verfahren zur spezifischen Hemmung der Aktivität solcher Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxyl-Gruppen im Substrat benötigen und katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten. Im erfindungsgemäßen Verfahren werden Substanzen mit der Formel zur Hemmung der katalytischen Aktivität verwendet. Dabei bedeutet R einen α -Aminosäure-, N-geschützten α -Aminosäure- oder Peptidylrest, dessen Struktur vom Zielenzym des betreffenden Inhibitors abhängt. Diese Struktur muß so beschaffen sein, daß die Peptidhydrolase eine Substanz mit einer -CONH-Gruppe anstelle des -CO-NH-OCO-Restes in der Formel als Substrat umsetzt. R₁ entspricht einem Phenylrest, der in ortho-, meta oder para-Stellung zur Carbonylgruppe keinen, einen oder in Kombination dieser Stellung zwei Substituenten, vorzugsweise F, Cl, Br, NO₂, CH₃, CH₃O, trägt. - Formel -

BEST COPY AVAILABLE

Verfahren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Peptidhydrolasen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der katalytischen Aktivität solcher Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxylgruppen im Substrat benötigen und insbesondere katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten. Solche Peptidhydrolasen können unter labordiagnostischen, medizinischen und lebensmitteltechnischen Gegebenheiten oder bei Verfahren auf diesen Gebieten mit unerwünscht hoher Aktivität auftreten.

Inhibitoren von Peptidhydrolasen werden als Feinchemikalien in der Biochemie, Molekularbiologie, Medizin, biochemischen Genetik, Pharmazie, sowie Lebensmittelwissenschaft und -industrie benötigt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher gelingt die gezielte Hemmung einiger Peptidhydrolasen insbesondere durch die Isolierung proteinartiger Substanzen aus pflanzlichen und tierischen Organismen (Ann.Rev.Biochem. 49, 593-626 (1980)) oder durch synthetisch zugängliche Substanzen, vorzugsweise aus der Klasse der Peptidaldehyde, der Peptidyl-halogenmethylketone, der Azapeptide und der Peptidyl-N-nitrosoamide (Methods in Enzymology, Bd. XLVI, Academic Press, New York 1977, S.3-240).

In einem typischen Verfahren zur Gewinnung eines natürlich vorkommenden Inhibitors für die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und die Gruppe der Kininogenasen wird inhibitorhaltiges Material aus *Helix pomatia* isoliert und über aufwendige Zentrifugationsschritte und säulenchromatographische Verfahren zum aktiven Inhibitor gereinigt (CH - PS Nr. 590063).

Von den synthetisch darstellbaren Inhibitoren ergeben sich für Peptid-

aldehyde und Azapeptide, insbesondere für solche, die mehrfunktionelle Aminosäuren enthalten, langwierige Darstellungsverfahren mit niedrigen Ausbeuten.

Peptidyl-N-nitrosoamide enthalten die als mutagen bekannte N-Nitrosoamidgruppe, wodurch eine Anwendung weitgehend eingeschränkt wird.

Die weiterhin beschriebenen Peptidyl-halogenmethylketone enthalten als α -Halocarbonylverbindungen eine für Nucleophile, wie sie in biologischen Flüssigkeiten in hohen Konzentrationen auftreten können, leicht angreifbar Halogenmethylgruppe. Die entstehenden Reaktionsprodukte besitzen nicht mehr die typischen Inhibitoreigenschaften der Peptidyl-halogenmethylketone, so daß unter solchen Bedingungen der Gehalt an aktiven Inhibitor am Wirkungsort schnell absinkt (Amer.Rev.Resp.Dis. 121, 381-387 (1980)).

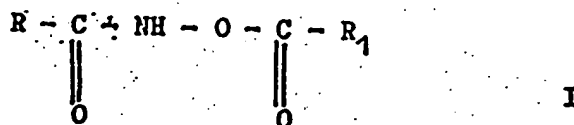
Außerdem hat sich gezeigt, daß Peptidyl-halogenmethylketone mit einer oder mehreren freien Aminofunktionen im Molekül, deren Zielenzyme damit als Aminopeptidasen gekennzeichnet sind, zusätzlich durch Cyclisierungsreaktionen destabilisiert werden, was ihre Verwendbarkeit weitgehend ausschließt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein leicht anwendbares, unter Anwendungsbedingungen genügend robustes Verfahren zur spezifischen Hemmung der katalytischen Aktivität solcher Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxylgruppen im Substrat benötigen und insbesondere katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren unter Anwendung stabiler und synthetisch leicht darstellbarer Inhibitoren hoher Spezifität für eine Anzahl von Peptidhydrolasen zur Verfügung zu stellen. Erfindungsgemäß erfüllt ein Verfahren unter Verwendung von Substanzen der allgemeinen Formel



diese Forderungen.

In der Formel bedeutet R einen α -Aminosäure-, zum Beispiel $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}$ für L-Alanin, einen N-geschützten α -Aminosäure- oder einen Peptidylrest, dessen genaue Struktur vom Zielenzym für den betreffenden Inhibitor abhängt. Diese Struktur muß so beschaffen sein, daß die betreffende Peptidhydrolase eine Substanz mit einer -CO-NH- Gruppe anstelle des -CO-NHCO- Restes in Formel I als Substrat umsetzt.

R_1 steht für einen Phenylrest, der in ortho-, meta- oder para-Stellung zur Carbonylgruppe keinen, einen oder in einer Kombination dieser Stellungen zwei Substituenten, vorzugsweise F, Cl, Br, NO_2 , CH_3 , CH_3O trägt.

Bei der Einwirkung der wäßrigen Lösung eines Stoffes der Formel I mit einem solchen Rest R der von der betreffenden Peptidhydrolase als Substrat erkannt wird, auf die im biologischen Material enthaltene oder die isolierte Peptidhydrolase unter äußeren Bedingungen, bei denen das Enzym üblicherweise seine katalytische Wirkung entfaltet, kommt es zu einer zeitabhängigen irreversiblen Hemmung der Enzymaktivität, die unter anderem von der Enzymkonzentration, der Inhibitorkonzentration und der Struktur der Reste R_1 und R abhängt.

Das erfindungsgemäße Verfahren entfaltet dabei seine Wirkung derart, daß nach Bindung der Inhibitoren an das Zielenzym ein Anion, im Falle der Struktur I also R-COO^- , abgespalten wird und das verbleibende hochreaktive Intermediat vom Typ R-CONH^+ selbst oder nach schnellen Umwandlungen solche chemische Gruppen im Enzym blockiert, die für das katalytische Geschehen bedeutsam sind. Diesen Typ der Hemmung eines Enzyms bezeichnet man als enzymaktivierte Inhibierung. Ein wichtiger Vorteil des Verfahrens unter Verwendung von Hemmstoffen auf dieser Basis besteht darin, daß die chemisch hochreaktive Gruppe des Inhibitors sich erst nach der Einwirkung auf das Zielenzym herausbildet, so daß unspezifische Hemmeffekte auf andere Peptidhydrolasen und chemische Nebenreaktionen weitgehend vermieden werden. Inhibitoren mit der Grundstruktur I zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus. Eine Variation dieser Spezifität zur Hemmung der verschiedenen Peptidhydrolasen mit katalytisch wirksamen Serin- oder Cysteinresten im Molekül gelingt in der Regel schon dadurch, daß zum Beispiel bei konstanten Rest R_1 (4-Nitrophenyl) der Rest R der Spezifität des Enzyms angepaßt wird. Die dazu nötigen synthetischen Operationen entsprechen den üblichen Methoden der Peptidchemie.

Gemische von Peptidhydrolasen lassen sich durch Gemische der für diese Hydrolasen spezifischen Inhibitoren hemmen.

Die erfindungsgemäßen Inhibitoren können auch als Salze zum Beispiel Hydrochlorid, Tosylat vorliegen.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an fünf Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Die in den Beispielen 2 bis 5 verwendeten Inhibitoren werden aus den entsprechenden Peptidylhydroxamsäuren nach folgender allgemeinen Vorschrift hergestellt.

2,67 mMol N-geschützte Peptidylhydroxamsäure werden in 5 ml Wasser unter Rühren mit 3 mMol NaOH und 2,7 mMol 4-Nitrobenzoylchlorid, gelöst in 5 ml Tetrahydrofuran, bei 5°C versetzt. Man läßt noch eine Stunde bei Raumtemperatur stehen und gießt die Mischung anschließend in 50 bis 100 ml Eiswasser. Der ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und über KOH getrocknet. Die Peptidyl-N(4-Nitrobenzoyloxy)amide werden in der Regel aus Ethylacetat umkristallisiert.

Beispiel 2

Dipeptidylpeptidase IV wurde unter Verwendung von Ala-Pro-N-(4-Nitrobenzoyloxy)amid . HCl irreversibel gehemmt.

Die Reaktionslösung enthielt $1,1 \cdot 10^{-3}$ mol/l Inhibitor, 0,037 mol/l Natriumphosphatpuffer (pH 7,6), KCl um die Ionenstärke auf 0,125 einzustellen und 0,3 µg Dipeptidylpeptidase IV. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms zur Inhibitorlösung gestartet und bei 30°C durchgeführt.

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 2,7 ml.

Im zeitlichen Abstand von 10 Minuten wurden Proben von 0,2 ml dem Reaktionsansatz entnommen und in einem Testansatz die verbliebene Enzymaktivität im Vergleich zu einem mitgelaufenen Blindwert ohne Inhibitor vermessen. Nach 20 Minuten war die Aktivität der Dipeptidylpeptidase auf 50% der Ausgangsaktivität gesunken, nach 120 Minuten war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität enthielt 0,037 mol/l

Natriumphosphat bei pH 7,6 und $2,0 \cdot 10^{-3}$ Ala-Pro-4-nitroanilid. Die Enzymaktivität wurde spektralphotometrisch anhand der Extinktionszunahme durch freigesetztes 4-Nitroanilin bei 390 nm ermittelt. Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2,7 ml. Gemessen wurde bei 30°C.

Beispiel 3

Im Humanurin enthaltene Dipeptidylpeptidase IV wurde unter Verwendung von Ala-Pro-N-(4-Nitro-benzoyloxo)amid . HCl irreversibel inhibiert. Zu dem im Beispiel 1 angegebenen Reaktionsansatz wurde anstelle eines Teils der Pufferlösung 0,5 ml Humanurin gegeben. Die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit wurde analog Beispiel 1 bestimmt. Nach 20 Minuten Reaktionszeit betrug die restliche Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV noch 50%, nach 120 Minuten war keine Aktivität mehr nachweisbar.

Beispiel 4

Thermitase (eine mikrobielle Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris*) wurde unter Verwendung von BOC-Ala-N-(4-nitrobenzoyloxo)amid irreversibel inaktiviert.

Die Reaktionslösung enthielt $4,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l Inhibitor und 0,033 mol/l Tris-Puffer (pH 7,5). Der Thermitasegehalt betrug $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/l; der Reaktionsansatz 1,5 ml wurde auf 30°C gehalten. Im zeitlichen Abstand von 2 Minuten wurden Proben von je 0,1 ml entnommen und im Testansatz auf die verbliebene Enzymaktivität im Vergleich zu einem mitgelaufenen Blindwert ohne Inhibitorzusatz vermessen.

Nach 2 Minuten betrug die Aktivität der Thermitase noch ca 50% des Ausgangswertes, nach 15 Minuten war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität enthielt 0,033 mol/l Tris-Puffer pH 7,5 (30°C) und $5,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l BOC-Ala-Ala-4-nitroanilid. Die Enzymaktivität wurde durch einen Extinktionsanstieg bei 390nm ermittelt.

Beispiel 5

Elastase aus Rind rpankreas wurde unter Verwendung von BOC-Ala-Pro-Ala-N-(4-Nitrobenzoyloxo)amid irr versib l inhibiert. Die Reaktionslösung nthi lt $2,8 \cdot 10^{-4}$ mol/l Inhibitor, 0,033 mol/l Tris-Puffer (pH 8,0)

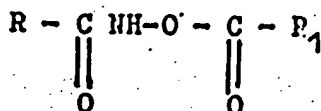
und 0,077 mol/l NaCl.

Der Elastasegehalt betrug $5,3 \cdot 10^{-6}$ mol/l, der Reaktionsansatz von 1,5 ml wurde bei 30°C gehalten. Im zeitlichen Abstand von 5 bis 10 Minuten wurden Proben von je 0,1 ml entnommen und im Testansatz auf die verbliebene Enzymaktivität im Vergleich zu einem mitgelaufenen Blindwert ohne Inhibitorzusatz vermessen. Nach 18 Minuten betrug die Aktivität der Elastase noch 50% des Ausgangswertes und war nach 120 Minuten mehr nachweisbar.

Der Testansatz enthielt 0,033 mol/l Natriumphosphat pH 7,0 und 2,4 . 10^{-4} mol/l BOC-Ala-4-nitrophenylester. Die Messung der Enzymaktivität wurde spektralphotometrisch bei 405 nm anhand des freigesetzten 4-Nitrophenols durchgeführt.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Aktivität von solchen Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freie Carboxylgruppe im Substrat benötigen und insbesondere katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten, gekennzeichnet dadurch, daß Substanzen der allgemeinen Formel I



angewandt werden; worin R eine α -Aminosäure, eine N-geschützte α -Aminosäure oder einen Peptidylrest, dessen genaue Struktur vom Zielenzym für den betreffenden Inhibitor abhängt, bedeuten, wobei diese Struktur so beschaffen ist, daß die betreffende Peptidhydrolase eine Substanz mit einer -CONH-Gruppe anstelle der -CONH-OCO-Gruppe in Formel I als Substrat umsetzt und P_1 für einen Phenylrest, der in ortho-, meta- oder para-Stellung zur Carbonylgruppe keinen, einen oder in einer Kombination dieser Stellungen zwei Substituenten, vorzugsweise F, Cl, Br, NO_2 , CH_3 , CH_3O trägt, steht, wobei der aktive Hemmstoff ein enzymaktiviertes Intermediat vom Nitrentyp darstellt.

2. Verfahren zur Hemmung von Peptidhydrolasen gekennzeichnet durch die Anwendung von Mitteln, die einen Inhibitor gemäß dem Verfahren in Anspruch 1 enthalten.